

Aus der Medizinischen Klinik II
des Klinikums Großhadern
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

HOCHMOLEKULARE PROTEOLIPIDKOMPLEXE IM
URIN BEI GESUNDEN UND PATIENTEN MIT
ERKRANKUNGEN DER NIERE, DER ABLEITEN-
DEN HARNWEGE UND DER PROSTATA

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Herbert Weiser
aus Sonthofen

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. D. Jüngst

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. PATIENTENKOLLEKTIV	5
3. UNTERSUCHUNGSGANG	7
4. METHODEN	10
4.1 Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins	10
4.2 Ultrafiltration und Einengen des Urins	10
4.3 Inkubation mit radioaktivem Tracer	10
4.4 Gelchromatographische Präparation	11
4.4.1 Vorreinigung über Sephadex G 100	11
4.4.2 Rechromatographie über Biogel A 5m	11
4.5 Proteinbestimmung	12

	Seite
4.6 Immunodiffusion nach Ouchterlony	12
4.7 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese	13
4.7.1 Delipidisierung	13
4.7.2 Inkubation	14
4.7.3 Gießen des Gradientengels	15
4.7.4 Durchführung der Elektrophorese	16
4.7.5 Fixierung und Färbung	17
4.7.6 Dokumentation und Auswertung der Elektropherogramme	17
4.8 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	18
4.9 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose	18
4.10 Gelchromatographie über Sephadex S 1000	19
4.11 Elektronenmikroskopie	19
5. REAGENZIEN UND GERÄTE	21
5.1 Testung; Konservieren; Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins	21
5.2 Ultrafiltration	21

	Seite
5.3 Inkubation mit radioaktivem Tracer	22
5.4 Gelchromatographische Präparation	22
5.5 Proteinbestimmung	23
5.6 Immunodiffusion nach Ouchterlony	23
5.7 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese	24
5.7.1 Delipidisierung	24
5.7.2 Inkubation	24
5.7.3 Gießen des Gradientengels	25
5.7.4 Fixierung und Färbung	26
5.7.5 Dokumentation und Auswertung der Elektropherogramme	26
5.8 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	26
5.9 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose	27
5.10 Gelchromatographie über Sephadex S 1000	27
5.11 Elektronenmikroskopie	28

	Seite
6. ERGEBNISSE	29
6.1 Gelchromatographische Präparation	29
6.1.1 Vorreinigung über Sephadex G 100	29
6.1.2 Rechromatographie über Biogel A 5m	31
6.2 Proteinbestimmung	35
6.3 Immunodiffusion nach Ouchterlony	36
6.4 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese	43
6.5 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	52
6.6 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose	54
6.7 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000	56
6.8 Elektronenmikroskopie	58
7. DISKUSSION	61
7.1 Testung; Konservieren; Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins	61

	Seite
7.2 Ultrafiltration	62
7.3 Inkubation mit radioaktivem Tracer	63
7.4 Gelchromatographische Präparation	63
7.5 Proteinbestimmung	64
7.6 Immunodiffusion nach Ouchterlony	65
7.7 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese	65
7.8 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	69
7.9 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose	70
7.10 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000	71
7.11 Elektronenmikroskopie	71
8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	73
9. LITERATURVERZEICHNIS	

1. EINLEITUNG

Erste Hinweise für das Auftreten plasmatischer Lipoproteine im Urin bei Patienten mit Nephrotischem Syndrom ergaben sich 1955 aufgrund papierelektrophoretischer Untersuchungen durch Schrade (37). Laudat (31) konnte 1968 im Urin gesunder Menschen alpha-Lipoproteine nachweisen; übereinstimmend damit gelang Segal (38) 1979 die Identifizierung von HDL-Apoproteinen im konzentrierten Urin von Normalpersonen.

Ein Anlaß, nach weiteren Proteolipidkomplexen im Urin zu forschen, ergab sich aufgrund umfangreicher Untersuchungen über die Ausscheidung von Cholesterin im Urin. Die täglichen Cholesterinexkretionsraten im Urin bewegen sich bei gesunden Menschen zwischen 0,2 und ca. 4 mg/die (9,10,14,16,18,41); der Anteil von unverestertem, freiem Cholesterin am Gesamtcholesteringehalt beträgt dabei etwa 80% (21,22). Erhöhte Cholesterinausscheidungsraten im Urin findet man vor allem beim Nephrotischen Syndrom, aber auch bei anderen Nierenerkrankungen, wie bestimmten Nephritiden oder tubulären Erkrankungen (9,16,27,28,29,34). Ebenfalls gesteigerte Werte wurden bei Erkrankungen der ableitenden Harnwege oder der Prostata (2,7,12,15,23,24,39) und schließlich auch bei Patientinnen

mit Karzinomen von Mamma, Uterus oder Ovarien gefunden (3,4,5,25).

Bereits bei normalen täglichen Ausscheidungsraten gesunder Menschen liegt die Konzentration an freiem Cholesterin deutlich über der physikalischen Wasserlöslichkeit. Polarisationsoptisch erkennbare doppelbrechende cholesterinhaltige Kristalle im Sinne der bekannten "Malteserkreuze" sind im Normalurin nicht nachweisbar, sodaß zumindest in diesen Fällen eine Ausscheidung des Cholesterins in Mikrokristallform nicht in Betracht zu ziehen ist.

Daher konzentrierte sich die Suche auf die Transportform des Cholesterins im Urin. Acevedo (1) kam 1970 aufgrund von Ultrafiltrationsuntersuchungen zu dem Schluß, das Urin-Cholesterin könnte als Proteolipidkomplex vorliegen. Cenedella (11) konnte 1981 durch Ultrazentrifugation aus dem Urin gesunder erwachsener Männer einen makromolekularen Proteolipidkomplex isolieren, der 80 - 90% des freien Urin-Cholesterins enthielt. Nähere Untersuchungen dieser Substanz auf bestimmte Marker-Enzyme, auf die Verteilung der einzelnen Lipid- und Proteinanteile und schließlich die elektronenmikroskopische Untersuchung ließen die Annahme zu, daß der größte Teil des Cholesterins im Urin als Membrankomponente, stammend aus den Zellen des Urogenitalsystems, vorliegt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam Jüngst (26). Mit Hilfe gelchromatographischer Verfahren konnte er ebenfalls nachweisen, daß der größte Teil des Urin-Cholesterins gebunden an einen hochmolekularen Proteolipidkomplex vorliegt. Immunologische Untersuchungen dieser Substanz zeigten vereinzelt einen geringen Anteil von Albumin, möglicherweise einer unspezifischen Kontaminanten; andere Blutplasmabestandteile ließen sich nicht nachweisen. Interessanterweise kam es bei der Immunodiffusion des cholesterinhaltigen Proteolipidkomplexes gegen Anti-LSP und Anti-KSP zu einer Präzipitation; (LSP (liver specific protein) und KSP (kidney specific protein) sind - im Gegensatz zu ihrer Bezeichnung - organunspezifische Zellmembranlipoproteine, gewonnen aus Leber- bzw. Nierengewebshomogenisaten (6)). Dieses Ergebnis unterstreicht die These der Herkunft cholesterinhaltiger Proteolipidkomplexe im Urin aus Zellmembranen oder ihren Bestandteilen.

Es war nun das Ziel der vorliegenden Arbeit, den beschriebenen hochmolekularen Proteolipidkomplex näher zu charakterisieren und bei bestimmten Erkrankungen der Niere, der ableitenden Harnwege und der Prostata auf eventuelle krankheitsspezifische Merkmale zu untersuchen. Im Vordergrund des Interesses stand dabei der Proteinanteil dieser Substanz,



da eine Kenntnis der beteiligten Proteine und ihre immunologische Charakterisierung eine gezielte weitergehende Analytik ermöglicht.

2. PATIENTENKOLLEKTIV

Es wurden insgesamt acht Gruppen zu jeweils fünf Personen gebildet; die nachfolgende Übersicht zeigt die Aufteilung auf die verschiedenen Erkrankungen sowie die Alters- und Geschlechtsverteilung:

Gruppe	Geschlecht		Alter
	weiblich	männlich	
Normalpersonen	2	3	22 - 69 Jahre
Nephrotisches Syndrom	3	2	19 - 62 Jahre
Nierenstein	2	3	18 - 77 Jahre
Solitäre Nierenzyste	1	4	25 - 75 Jahre
Nierenkarzinom	2	3	25 - 82 Jahre
Blasenkarzinom	-	5	60 - 85 Jahre
Prostataadenom	-	5	61 - 82 Jahre
Prostatakarzinom	-	5	57 - 77 Jahre

Es handelte sich durchweg um Patienten in stationärer Behandlung der Medizinischen Kliniken I - III und der Urologischen Klinik des Klinikums Großhadern der Universität München. In der Gruppe der "Normalpersonen" lagen keinerlei Hinweise anamnestischer, klinischer oder laborchemischer Art auf Erkrankungen der Niere, der ableitenden Harnwege oder der Prostata vor. Die Diagnosen der Patienten wurden den Kran-

kenblättern entnommen; bei den Karzinompatienten war sichergestellt, daß zur Zeit der Urinprobensammlung keine zytostatische Therapie zur Anwendung kam.

3. UNTERSUCHUNGSGANG

Der Präparation lag das von Jüngst (26) angegebene Schema zugrunde.

Verwendet wurde der Morgenurin der Patienten; Proben mit makroskopisch erkennbarer Blutbeimengung (0,5 - 1 ml Blut pro Liter Urin) wurden ausgeschlossen, um eine Kontamination durch zelluläre oder plasmatische Blutbestandteile zu vermeiden.

Eine Untersuchung des Materials mit N-Multistix-Reagenzstreifen diente der orientierenden Bestimmung von Eiweiß, Glucose, Bilirubin, Blut, Ketonen, Nitrat und Urobilinogen.

Nach Zugabe von 0,2 g Natriumazid (NaN_3) und 0,05 mmol Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) pro Liter Urin zur Vermeidung von mikrobiellem Wachstum wurden die Proben entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -40°C tiefgefroren.

Anschließend erfolgte die Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins (40) durch Zugabe von Natriumchlorid und Zentrifugation; die Entfernung dieser Substanz erleichterte die nachfolgende Ultrafiltration und Einengung des Urins.

Als radioaktiver Tracer wurde dem aufkonzentrierten Urin ^3H -Cholesterin zugegeben (13); das radioaktiv

markierte Cholesterin steht im Austausch mit freiem Cholesterin und markiert somit jene Bestandteile, die unverestertes Cholesterin enthalten.

Die weitere Präparation erfolgte gelchromatographisch, zunächst zur Vorreinigung auf einer mit Sephadex G 100 beschickten Säule, anschließend zur feineren Trennung auf einer Biogel A 5m - Säule. Die Radioaktivität enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und über Kollodiumhülsen eingeengt; sie stellten das Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Untersuchungen dar.

Im einzelnen wurden die Proben mit folgenden Verfahren weiteruntersucht:

- Bestimmung des Proteingehalts
- Immunodiffusion nach Ouchterlony gegen Anti-LSP, Anti-KSP und Antikörper gegen Humanserumbestandteile
- SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese; hierfür wurden die Proben jeder Krankheitsgruppe zusammengefaßt
- Ultrazentrifugation im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten
- Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose
- Gelchromatographie über Sephacryl S 1000
- Elektronenmikroskopie

Die letztgenannten vier Verfahren wurden nur auf Proben der Gruppe "Normalpersonen" angewendet.

Nachfolgend sei zur Übersicht noch einmal der Untersuchungsgang in Form eines Flußdiagramms dargestellt:



4. METHODEN

4.1 Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins (40)

Die Probe wurde mit Kochsalz bis zu einer Konzentration von 0,56 mmol/l versetzt und bei 4°C über Nacht auf einem Magnetrührer durchmischt. Die ausgefällten Bestandteile wurden anschließend bei 4°C für 30 Minuten bei 9000 upm zentrifugiert und der Überstand dekantiert; eine Filtration des Dekantats über Selecta-Faltenfilter entfernte etwaige resuspendierte Feststoffteilchen.

4.2 Ultrafiltration und Einengen des Urins

Die Ultrafiltration des Urins erfolgte bei 4°C über XM 100 - Membranen (Fa. Amicon) unter Verwendung der Rührzellen Amicon 402 und 52, wobei die Proben bei Stickstoff-Überdruck von etwa 2 bar auf 3 - 5 ml eingeengt wurden.

4.3 Inkubation mit radioaktivem Tracer (13)

Zur Markierung wurde pro ml Probe 0,1 uCi ^3H -Chole-

sterin zugegeben und das Material für 2 Stunden bei Zimmertemperatur auf dem Magnetrührer inkubiert.

4.4 Gelchromatographische Präparation

4.4.1 Vorreinigung über Sephadex G 100

Die Vorreinigung diente der Abtrennung von Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 100.000. Hierzu wurden 3 - 5 ml der inkubierten Probe auf eine mit Sephadex G 100 beschickte Glassäule von 100 cm Länge und 2,5 cm Innendurchmesser aufgetragen und unter Verwendung eines Puffers mit 0,15 mmol/l NaCl, 0,1 g/l Na₂EDTA, 0,2 g/l NaN₃ und 0,05 mmol/l PMSF eluiert; der hydrostatische Druck betrug etwa 15 cm H₂O. Dabei wurden 60 Fraktionen zu je 8 ml gesammelt und jeweils bei 280 nm spektralphotometrisch die Extinktion gemessen. Ein Aliquot jeder Fraktion von 0,1 ml wurde mit 4 ml Szintillationslösung versetzt und im Betaszint 5000 die Zerfälle des Tritiums pro Minute ermittelt. Die Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und über Kollodiumhülsen auf 3 - 5 ml eingeeengt.

4.4.2 Rechromatographie über Biogel A 5m

Die eigentliche Präparation des Proteolipidkomplexes erfolgte auf einer 120 cm langen Biogel A 5m -

Säule mit 1,8 cm Innendurchmesser. Die Elution wurde unter den gleichen Bedingungen wie unter Punkt 4.4.1 beschrieben durchgeführt. Die im Ausschlußvolumen der Säule laufenden Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und eingeengt; sie stellten das Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Untersuchungen dar.

4.5 Proteinbestimmung

Der Probe wurde im Überschuß 20%-ige Trichloressigsäure zugegeben, das Sediment abzentrifugiert und in 1-molarer Natronlauge aufgelöst. Unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard erfolgte nach Lowry (33) die Eiweißbestimmung mit Hilfe des Folin-Reagens.

4.6 Immunodiffusion nach Ouchterlony (35)

Die radiale doppelte Immunodiffusion nach Ouchterlony wurde in 2% Bacto-Agar durchgeführt. Zur Herstellung des Agars wurden 1,5 g Bacto-Agar in 50 ml Barbitol-Acetat-Puffer (13,4 g 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz, 8,8 g Natriumacetat · 3 H₂O, ca. 180 ml 0,1 n HCl, A. bidest. ad 1500 ml,

pH 8,2) und 50 ml A. bidest. bis zur Bildung einer klaren Lösung im Wasserbad erhitzt. Die Immunodiffusion erfolgte in üblicher Weise auf gelbeschichteten Objektträgern; in die Gelschicht wurde das bekannte 7 - Loch - Muster mit Hilfe einer Stanze eingebracht.

Die Auswertung wurde nach 48 - stündiger Inkubation in der feuchten Kammer im Dunkelfeld vorgenommen. Die Färbung erfolgte nach einem von Lamerz (30) beschriebenen Verfahren unter Verwendung der Farbstoffe Amidoschwarz 10 B und Ölrot O.

Eingesetzt wurden käufliche Antikörper gegen humanes Apolipoprotein A, Apolipoprotein B und Albumin sowie die bereits erwähnten Antikörper Anti-LSP und Anti-KSP.

4.7 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden die fünf Präparate jeder Krankheitsgruppe zusammengefaßt.

4.7.1 Delipidisierung

Um eine saubere Trennung der einzelnen Banden zu erreichen, mußte das Material vor der Elektrophorese delipidisiert werden. Dazu wurde die Probe

mit dem gleichen Volumen Diäthyläther überschichtet, 20 Minuten im Rotator geschüttelt, 10 Minuten bei 4000 upm zentrifugiert und die Ätherphase abgenommen. Diese Schritte wurden anschließend noch zweimal wiederholt. Zur weiteren Reinigung wurde die wäßrige Phase 48 Stunden bei 4°C gegen A. bi-dist. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

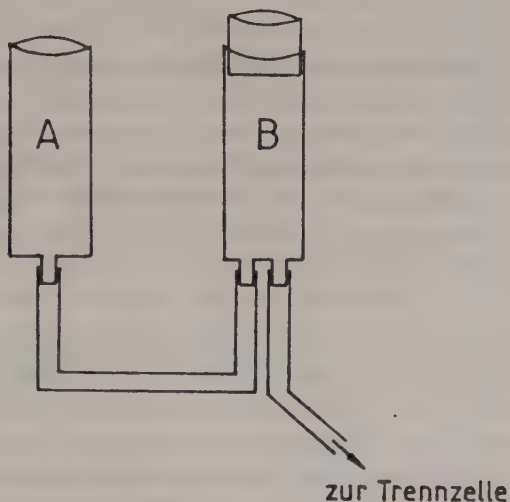
4.7.2 Inkubation

Für die Inkubation wurden die Lyophilisate gelöst in einem Tris-HCl-Puffer, bestehend aus 37,5 mM Tris, 2% SDS, 4% 2-Mercaptoäthanol und 10 % Sucrose, der mit HCl auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt war. Dabei wurde das zugegebene Puffervolumen so bemessen, daß eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml nicht überschritten wurde.

Die Inkubation erfolgte zunächst für 5 Minuten bei 100°C, anschließend wurde 4 Tage lang im Wasserbad bei 50°C weiterinkubiert. Hierzu mußten aufgrund der teilweise sehr geringen Volumina im Mikroliterbereich die Proben in Glaskapillaren eingeschmolzen werden, was eine problemlose weitere Handhabung gewährleistete. Nach der Inkubation wurden die Kapillaren 20 Minuten bei 3000 upm zentrifugiert und der Überstand - nach Ritzen und Brechen der Kapillaren - mit einer Eppendorff-Pipette abgenommen.

4.7.3 Gießen des Gradientengels

Die Herstellung des Gradientengels wurde nach einer modifizierten Rezeptur der Firma LKB vorgenommen (35). Zur Verwendung kam ein einfacher selbstgebauter Gradientenmischer:



Für die beiden Gefäße A und B wurden 20 ml - Einwegspritzen verwendet, die durch einen kurzen Schlauch verbunden sind. Gefäß A enthält eine spezifisch leichte Lösung ohne Acrylamid, während die spezifisch schwere Lösung in Gefäß B 20% Glycerin und 22,5% Acryl-

amid enthält. Bei Verschuß des Gefäßes B durch einen Gummistopfen und kräftiger Durchmischung der Lösung B auf einem Magnetrührer bildet die in die Trennzelle abfließende Lösung einen hervorragend reproduzierbaren konkav exponentiellen Konzentrationsgradienten. Die Maße des auspolymerisierten Gels betragen $11 \times 11 \times 0,15$ cm, die Acrylamidkonzentration nimmt von 7% an der Auftragsstelle in Laufrichtung auf 22,5% am unteren Ende des Gels zu. Vor der Polymerisation des Gels wurde ein Profilformer eingesetzt, der 12 Probenauftragstaschen an der Oberkante des Gels bildet. Da jede Trennzelle 2 Gele enthält, konnten somit pro Elektrophorese 24 Proben verarbeitet werden.

4.7.4 Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde auf dem Gerät Havana (Fa. Desaga) vorgenommen, das eine Trennung von Substanzen in vertikalen, beidseits gekühlten Flachgelen ermöglicht. Üblicherweise wurden in die Taschen 1 und 12 jedes Gels Kalibrierungssubstanzen bekannten Molekulargewichts gegeben, die ebenfalls nach dem unter Punkt 4.7.2 beschriebenen Verfahren aufbereitet worden waren; auf die Taschen 2 - 11 wurde die zu untersuchende Probe in einer absteigenden Verdünnungsreihe des Faktors 2 aufgetragen. Pro Tasche wurde ein Volumen von 20 μ l appliziert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 14°C mit einem Strom von ca. 180 mA und dauerte etwa 4 1/2 Stunden. Als Elektrodenpuffer wurde eine Lösung mit 0,303% Tris, 1,44% Glycin, 0,1% SDS und 0,001% Natriumazid verwendet.

4.7.5 Fixierung und Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entnommen und 30 Minuten in 20%-iger Trichloressigsäure fixiert. Die Säure wurde durch 30-minütiges Waschen in A. dest. entfernt und anschließend die Färbung nach einer modifizierten Version des von Jäckle (19) angegebenen Verfahrens unter Verwendung von Coomassie Brilliant Blue G-250 anstelle R-250 vorgenommen.

4.7.6 Dokumentation und Auswertung der Elektropherogramme

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte zum einen photographisch durch Ablichten der gefärbten Gele, zum anderen durch Densitometrie.

Bei der Auswertung wurde auf die übliche logarithmische Darstellung der Molekulargewichte gegen die relativen Laufweiten (r_f -Werte) der Proteinbanden (42) verzichtet. Stattdessen erfolgte die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe eines Computers durch polynomiale Interpolation nach dem Newton-

Verfahren (8), wobei die absoluten Laufweiten der Referenzproteine die Stützpunkte eines Polynoms 5. Ordnung bildeten. Anhand dieses Polynoms wurden die Molekulargewichte unter Zugrundelegung der absoluten Laufweiten der einzelnen Banden ermittelt.

4.8 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Hierzu wurden 0,5 ml der Probe in 4 ml Cäsiumchloridlösung der Dichte 1,25 mg/ml eingebracht und bei 4°C 72 Stunden lang unter Vakuum in einem Aus-schwingrotor bei 50.000 upm - entsprechend einer Beschleunigung von ca. 256.000 g in Röhrchenmitte - zentrifugiert. Zur Auswertung wurden der Reihe nach 11 Fraktionen zu je 0,4 ml abgenommen; in jeder einzelnen Fraktion wurden die Extinktion bei 280 nm, die Radioaktivität und die Dichte durch Abwiegen bestimmt.

4.9 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose (36)

Eine silikonisierte Pasteurpipette wurde nach Ver-stopfen des Auslasses mit silanisierter Glaswolle mit Puffer (0,02 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5)

durchgespült und anschließend 1 ml Con A - Sepharose-Gel eingefüllt.

Die Chromatographie erfolgte durch Auftragen von 0,1 ml Probe und Nachspülen mit Puffer, wobei 10 getrennte Fraktionen zu je 1 ml separiert wurden. Zur Elution der gebundenen Anteile wurde mit Puffer nachgespült, der zusätzlich 0,5 M Methyl-alpha-Glucopyranosid enthielt. Anschließend erfolgte im Betaszint 5000 die Messung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen nach Zugabe von Szintillationslösung.

4.10 Gelchromatographie über Sephadex S 1000

Zur Verwendung kam eine Glassäule der Länge 50 cm mit einem Innendurchmesser von 1,5 cm. Nach Auftragen eines Probenvolumens von 1 ml erfolgte die Chromatographie wie unter Punkt 4.4.1 beschreiben. Es wurden Fraktionen zu je 1,7 ml gesammelt und nach Zugabe von Szintillationslösung die Radioaktivität gemessen.

4.11 Elektronenmikroskopie

Diese Untersuchungen wurden im Institut für Diabe-

tesforschung München, Abteilung Elektronenmikroskopie, durchgeführt.

Zur Verwendung kamen mit 0,5% Formvar beschichtete Kupfernetzchen, die mit Kohle bedampft und beglimmt und anschließend 30 Sekunden mit der zu untersuchenden Probe benetzt wurden. Zur Erzielung des negative-stainig-Effektes erfolgte die Kontrastierung mit 2%-iger Phosphorwolframsäure, die mit Kalilauge auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt worden war (20).

Die Elektronenmikroskopie selbst wurde auf einem Gerät des Typs 101 (Fa. Siemens) bei einer Spannung von 80 kV und einer Vergrößerung von 120.000 durchgeführt.

5. REAGENZIEN UND GERÄTE

5.1 Testung; Konservieren; Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins

- N-Multistix-Reagenzstreifen, Fa. Ames Diagnostica, Frankfurt
- Natriumazid NaN_3 , Fa. Merck, Darmstadt
- Phenylmethansulfonylfluorid PMSF, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid NaCl , Fa. Merck, Darmstadt
- Selecta-Faltenfilter Nr. 1117 1/2, Fa. Schleicher-Schüll

5.2 Ultrafiltration

- Ultrafiltrationsmembranen XM 100, Fa. Amicon, Danvers, Mass., USA
- Rührzellen 402 und 52, Fa. Amicon, Danvers, Mass., USA
- Flüssigkeitsbehälter RS 4, Fa. Amicon, Danvers, Mass., USA

5.3 Inkubation mit radioaktivem Tracer

- (1,2-³H(N))-Cholesterol Net. 139, Fa. New England Nuclear, Boston, Mass., USA

5.4 Gelchromatographische Präparation

- Sephadex G 100, 40 - 120 u, Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- Biogel A 5m, 200 - 400 mesh, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA
- Natriumchlorid NaCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Dinatriumäthylendinitrilotetraessigsäure Na₂EDTA, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumazid NaN₃, Fa. Merck, Darmstadt
- Phenylmethansulfonylfluorid PMSF, Fa. Merck, Darmstadt
- Szintillationslösung, Fa. Roth, Karlsruhe
- Glassäule 100 cm Länge x 2,5 cm Innendurchmesser, Fa. Bender und Hobein, München
- Glassäule 120 cm Länge x 1,8 cm Innendurchmesser, Fa. Bender und Hobein, München
- Fraktionskollektor Model 328, Fa. Instrumentation Specialties Co., Lincoln, Nebr., USA
- Präzisions-Quarzküvetten, Fa. Hellma, Müllheim
- Spektralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA

- Zählröhrchen, Fa. W. Zinsser, Frankfurt
- Szintillationszähler Betaszint BF 5000, Fa. BF-Vertriebs-GmbH, München
- Kollodiumhülsen SM 13200, Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen
- Kollodiumhülsenhaltevorrichtung SM 16304, Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen

5.5 Proteinbestimmung

- Trichloressigsäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid NaOH, Fa. Merck, Darmstadt
- Kupfersulfat CuSO_4 , Fa. Merck, Darmstadt
- Kaliumnatriumtartrat, Fa. Merck, Darmstadt
- Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens, Fa. Merck, Darmstadt

5.6 Immunodiffusion nach Ouchterlony

- 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumacetat, Fa. Merck, Darmstadt
- Salzsäure HCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Bacto-Agar, Fa. Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA

- Amidoschwarz 10 B, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Ölröt O, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Antiserum gegen humanes Apolipoprotein A, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen humanes Apolipoprotein B, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen Humanserum, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen LSP und KSP, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau U. Behrens, Immunopathology Laboratory, Veterans Administration Medical Center, Bronx, New York, USA
- Stanze für Ouchterlony, Fa. Boskamp GmbH, Hersel/Bonn

5.7 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese

5.7.1 Delipidisierung

- Diäthyläther, Fa. Merck, Darmstadt

5.7.2 Inkubation

- Trishydroxymethylaminomethan Tris, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Natriumdodecylsulfat SDS, Fa. Serva Feinbioche-

mica, Heidelberg

- 2-Mercaptoäthanol, Fa. Merck-Schuchard, Hohenbrunn/München
- Sucrose, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA
- Salzsäure HCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Meßkapillaren 50 µl, Fa. DADE Diagnostics Inc., Miami, Flor., USA

5.7.3 Gießen des Gradientengels

- Acrylamid, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- N,N'-Methylen-Bisacrylamid, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Ammoniumpersulfat, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA
- N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin TEMED, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Trishydroxymethylaminomethan Tris, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Natriumdodecylsulfat SDS, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Natriumazid NaN_3 , Fa. Merck, Darmstadt
- Glycin, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA
- Glycerin, Zentralapotheke des Klinikums Großhadern, München
- Doppeltrennzelle, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidel-

berg

- Blindzelle, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg
- Netzanschlußgerät, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg
- Kryostat, Fa. Colora Meßtechnik GmbH, Lorch

5.7.4 Fixierung und Färbung

- Trichloressigsäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Kupfersulfat CuSO_4 , Fa. Merck, Darmstadt
- Essigsäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Coomassie Brilliant Blue G-250, Fa. Serva
Feinbiochemica, Heidelberg
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt

5.7.5 Dokumentation und Auswertung der Elektrophogramme

- Densitometer Quick-Scan Jr. TCL, Fa. Helena Laboratories, Vertrieb Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg

5.8 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

- Cäsiumchlorid CsCl , Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Cellulosenitrat-Zentrifugenröhrchen, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA

- Rotor SW 60, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- Ultrazentrifuge Model L5-75, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA

5.9 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose

- Silikonlösung, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Glaswolle reinst, silanisiert, für Gaschromatographie, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Con A - Sepharose 4 B, Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- Trishydroxymethylaminomethan Tris, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Natriumchlorid NaCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Salzsäure HCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Methyl-alpha-Glucopyranosid, Fa. Serva, Heidelberg

5.10 Gelchromatographie über Sephadex S 1000

- Sephadex S 1000, Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

- Glassäule 50 cm Länge x 1,5 cm Innendurchmesser,
Fa. Bender und Hobein, München

5.11 Elektronenmikroskopie

- Polaron G-400 Kupfernetzchen, beschichtet mit
0,5% Polyvinylformal, Fa. VeCo, Solingen
- Wolframato-phosphorsäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Elektronenmikroskop Typ 101, Fa. Siemens, Erlan-
gen

6. ERGEBNISSE

6.1 Gelchromatographische Präparation

6.1.1 Vorreinigung über Sephadex G 100

Makroskopisch fanden sich in dem aus dem Ausschlußvolumen der Säule gewonnenen Material einige Fraktionen mit einer leicht trüben, weißlich opaleszierenden Flüssigkeit, die vom Aspekt her an VLDL erinnerte. Deutlich retiniert wurden die gelbbraunen Urinpigmente, die entsprechend später von der Säule eluiert wurden.

Nach Messung der Radioaktivität und der Extinktion bei 280 nm in jeder einzelnen Fraktion konnten Elutionsprofile erstellt werden; Abb. 1 stellt ein typisches Chromatogramm dar:

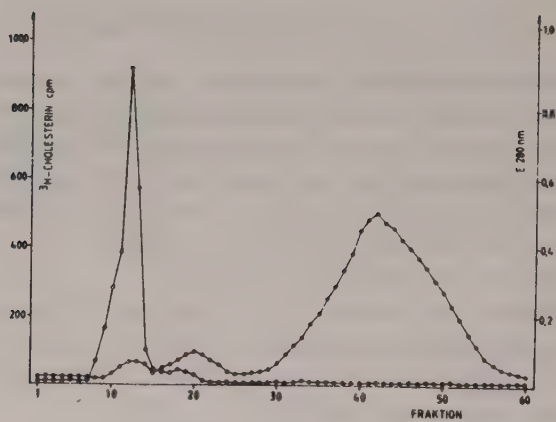


Abb. 1

Elutionsprofil des Urins über Sephadex G 100

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

○—○ Extinktion bei 280 nm

Es zeigt sich, daß das gesamte unveresterte Cholesterin, markiert durch das zugegebene ^3H -Cholesterin, im Ausschlußvolumen der Säule, also im Molekulargewichtsbereich über 100.000 zu finden ist.

Die Extinktion bei 280 nm dagegen bildet eine doppelgipflige Kurve, deren erster Peak mit dem Radioaktivitätsmaximum korreliert; der zweite Gipfel läßt sich im Retentionsvolumen der Säule nachweisen. Eine Proportionalität zwischen Peakhöhe bzw. -volumen und Proteinmenge sollte jedoch nur mit Vorbehalt angenommen werden, da bekanntlich auch Nichtproteine eine nicht zu vernachlässigende Absorption bei 280 nm aufweisen können; spezielle Störfaktoren stellen im vorliegenden Fall die Urinpigmente dar. Der Verlauf der Extinktionskurve bei 280 nm läßt daher nur orientierende Rückschlüsse auf die Proteinverteilung zu.

6.1.2 Rechromatographie über Biogel A 5m

Wiederum fand sich in einigen Fraktionen des Ausschlußvolumens die opaleszierende, VLDL-ähnliche Flüssigkeit.

Ein typisches Elutionsprofil sei nachfolgend dargestellt (Abb. 2):

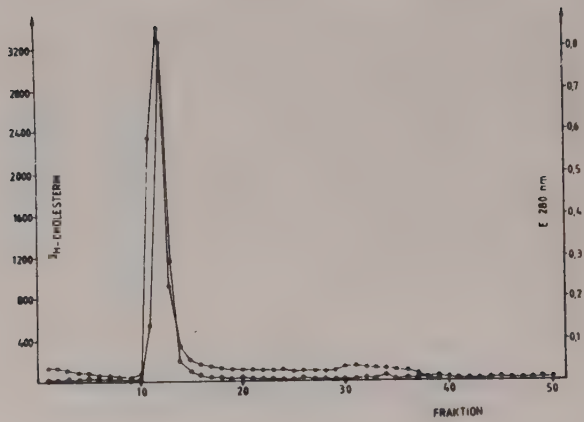


Abb. 2

Rechromatographie des Materials über Biogel A 5m

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

○—○ Extinktion bei 280 nm

Auch hier wird praktisch das gesamte Cholesterin im Ausschlußvolumen, also im Molekulargewichtsreich über 5 Mio. eluiert. Die Kurve der Extinktion bei 280 nm korreliert entsprechend und zeigt im Retentionsvolumen geringe, aber bei allen untersuchten Proben regelmäßig nachweisbare Proteinmengen an.

Abweichend von dem oben dargestellten Chromatogramm zeigte sich bei allen Patienten mit Nephrotischem Syndrom und bei zwei Patienten mit fortgeschrittenem Prostata- bzw. Blasenkarzinom eine mehrgipflige Radioaktivitätsverteilung. Nachstehend sei ein Chromatogramm eines Patienten mit Nephrotischem Syndrom dargestellt (Abb. 3):

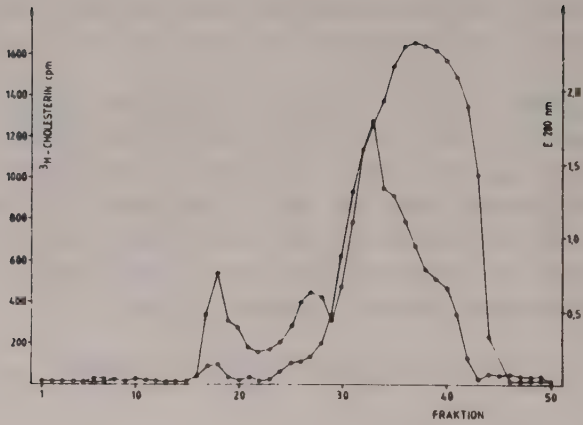


Abb. 3

Chromatogramm über Biogel A 5m eines Patienten mit Nephrotischem Syndrom

- ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute
- Extinktion bei 280 nm

Ein sehr ähnliches Elutionsprofil entsteht nach Auftragen menschlichen Serums auf die Säule. Die drei Radioaktivitätsgipfel entsprechen dabei den Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL. Da bekanntermaßen beim Nephrotischen Syndrom Serumproteine in den Urin übergehen, läßt sich das obige Chromatogramm zwanglos durch den Übertritt von Plasmabestandteilen in den Urin erklären, eine Vermutung, die sich durch immunologische Untersuchungen bestätigen ließ (s.u.).

6.2 Proteinbestimmung

Die präparierten Proteinmengen schwankten stark in Abhängigkeit vom verarbeiteten Probenvolumen und der zugrundeliegenden Erkrankung. Erwartungsgemäß die höchsten Proteinmengen bis zu 100 mg je Probe wurden bei Patienten mit Nephrotischem Syndrom gefunden, während sie sich bei den anderen Erkrankungen meist im Bereich von 0,1 - 5 mg bewegten; bei Patienten aus der Gruppe der "Normalpersonen" lagen die Proteinkonzentrationen teilweise unterhalb der Nachweisgrenze.

6.3 Immunodiffusion nach Ouchterlony

Bei der Untersuchung des präparierten hochmolekularen Materials aus dem Säulenausschlußvolumen zeigte sich in der doppelten radialen Immunodiffusion regelmäßig eine positive Reaktion gegen Anti-LSP und Anti-KSP (Abb.4):

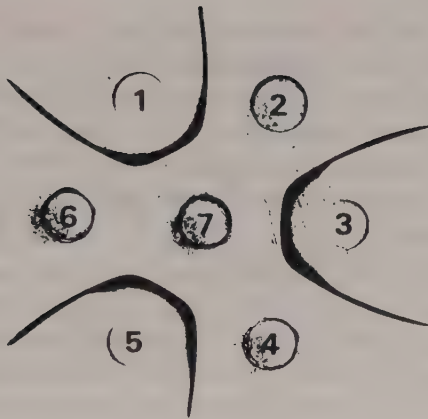


Abb. 4

Immunodiffusion des hochmolekularen Komplexes
(2,4,6,7) gegen Anti-LSP (1,3) und Anti-KSP (5).

Lediglich bei einigen Proben aus der Gruppe der "Normalpersonen" ließen sich aufgrund des niedrigen Proteingehaltes keine Präzipitationslinien nachweisen.

In etwa 40% der Fälle zeigte sich eine Präzipitation gegen Anti-Humanalbumin und in denselben Proben eine positive Reaktion gegen Anti-Humanserum mit solitären Präzipitationslinien, ein Hinweis darauf, daß als einziger Plasmabestandteil Albumin regelmäßig in dem hochmolekularen Komplex nachweisbar ist.

Bei Proben, deren Elutionsprofil eine mehrgipflige Radioaktivitätskurve aufwies, wurden die entsprechenden Fraktionen ebenfalls zusammengefaßt und immunologisch untersucht. Erwartungsgemäß ließ sich im zweiten Peak eine Präzipitation gegen Anti-Apo B (Abb. 5) und im dritten Peak entsprechend eine positive Reaktion gegen Anti-Apo A nachweisen (Abb. 6), ein Hinweis darauf, daß in diesen Fraktionen LDL und HDL vorhanden sind.

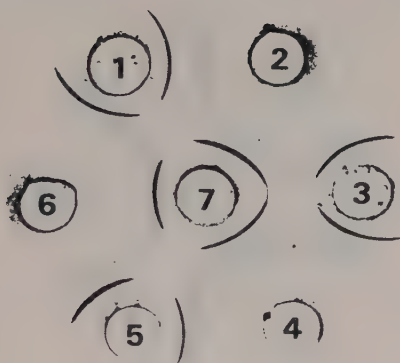


Abb. 5

Immunodiffusion von Material aus dem zweiten Peak
(1,3,5,7) gegen Anti-Apo B (2,4,6)

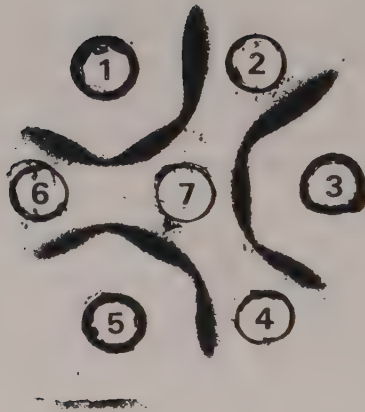


Abb. 6

Immunodiffusion von Material aus dem dritten Peak
(2,4,6,7) gegen Anti-Apo A (1,3,5)

Die Immunodiffusion dieser Proben gegen Anti-Human-serum zeigte mehrfache Präzipitationslinien (Abb. 7), sodaß mit der Anwesenheit weiterer Serumbestandteile in diesen Elutionsmaxima zu rechnen ist.



Abb. 7

Immunodiffusion von Material aus dem zweiten Peak
(1 - 6) gegen Anti-Humanserum (7)

6.4 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese

In Abb. 8 ist das Densitogramm einer Elektrophorese der Kalibrierungsproteine dargestellt:

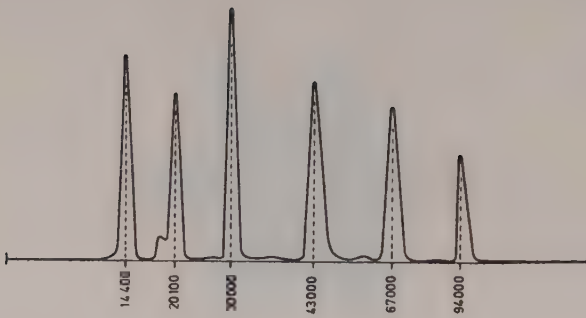


Abb. 8

Densitogramm einer Elektrophorese der Kalibrierungs-
proteine

Die Abbildung läßt die hohe Trennschärfe der Gradientengel-Elektrophorese erkennen.

Als Beispiel für eine elektrophoretische Auftrennung des Proteinanteils der hochmolekularen Proteolipide sei in Abb. 9 die Elektrophorese von Material aus der Patientengruppe "Prostataadenom" dargestellt:

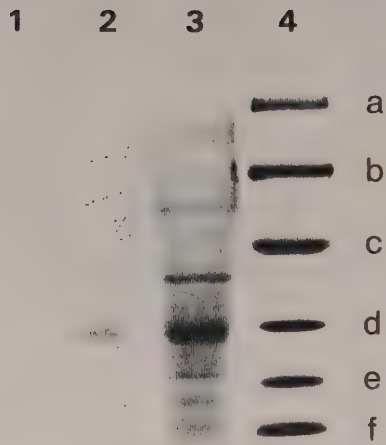


Abb. 9

Elektrophorese von Material aus der Patientengruppe
"Prostataadenom" (Spalte 1 - 3)

Die Spalte 4 der Abb. 9 zeigt die Kalibrierungs-
proteine mit den Molekulargewichten

a:	94.000
b:	67.000
c:	43.000
d:	30.000
e:	20.100
f:	14.400

Die folgende Abb. 10 zeigt das zugehörige Densito-
gramm:

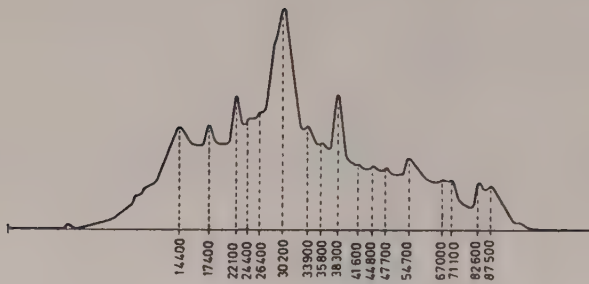


Abb. 10

Densitogramm der in Abb. 9 dargestellten Elektro-
phorese

In der nachfolgenden Übersicht sind die ermittelten Molekulargewichte der Proteinbanden mit Aufteilung auf die einzelnen Patientengruppen tabellarisch dargestellt.

Tabellarische Übersicht der einzelnen Proteinbanden mit Aufteilung auf die jeweiligen Patientengruppen:

N.P. = Normalpersonen
 N.S. = Nephrotisches Syndrom
 N.St. = Nierenstein
 N.Z. = Nierenzyste

N.K. = Nierenkarzinom
 B.K. = Blasenkarzinom
 P.A. = Prostataadenom
 P.K. = Prostatakarzinom

Die einzelnen Proteinbanden sind durch ein x gekennzeichnet, besonders ausgeprägte Banden durch ein X.

Die letzte Spalte gibt die maximale Abweichung einzelner Molekulargewichte vom Mittelwert einer Zeile an.

Molekular- gewicht	N.P.	N.S.	N.St.	N.Z.	N.K.	B.K.	P.A.	P.K.	Max.Abweichung in %
14.400			x	x		x	X	X	1,3
15.300		x			x	x			1,9
16.500	x				x			X	0,7
17.500			X	x	X		X		2,1
19.200		x				X			1,0
21.100		X		x					1,7
22.200			x				X		0,8
24.200	x	x				x	x	X	0,7
25.700					x		x		2,3
28.000		X		X		x		X	2,2
29.100	x		X		x				0,5
30.100	X						X	x	1,0

Molekular- gewicht	N.P.	N.S.	N.St.	N.Z.	N.K.	B.K.	P.A.	P.K.	Max.Abweichung in %
31.000						X			-
33.100	x		x	x				X	1,4
34.100	x	x	x	x			x		1,2
35.800							x		-
37.800	X	X	X	x	X	x	X	X	2,2
40.000						X			-
41.600						x			0,1
43.400			x	x			x		0,3
44.800							x		-
47.100				x		x	x		1,2
52.200			x			x			1,0
54.300				x			x		0,8
61.700						x			-
64.600	X			X					1,0
67.000							x		-
71.700			x	x			x		1,7
76.000						x			-
79.400	x								-
82.600							x		-
88.000	x						x		0,6
92.200						x			-

Die Übersicht läßt die hohe Reproduziergenauigkeit und Präzision der Elektrophorese erkennen; die Abweichungen der einzelnen Molekulargewichte vom Durchschnitt betragen durchweg weniger als 2,5%.

Bei einer auf den ersten Blick verwirrenden Heterogenität fallen dennoch die Banden mit den Molekulargewichten 14.400, 17.500, 24.200, 28.000, 33.100, 34.100 und 37.800 auf, die jeweils in mindestens vier der Proben nachzuweisen waren. Besonders die Proteinbande mit dem Molekulargewicht 37.800 verdient Beachtung: Sie ist in sämtlichen Proben nachzuweisen und in den meisten Fällen auch als besonders ausgeprägter Peak zu sehen. Das übrige Verteilungsmuster erscheint relativ unauffällig; weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen müssen klären, ob solitäre Banden bei bestimmten Krankheitsgruppen, wie z.B. die Proteine mit den Molekulargewichten 31.000 und 40.000 bei Patienten mit Blasenkarzinom, eindeutig reproduzierbar nachgewiesen werden können.

6.5 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Ein typisches Ergebnis nach 72 Stunden Ultrazentrifugation ist in Abb. 11 dargestellt:

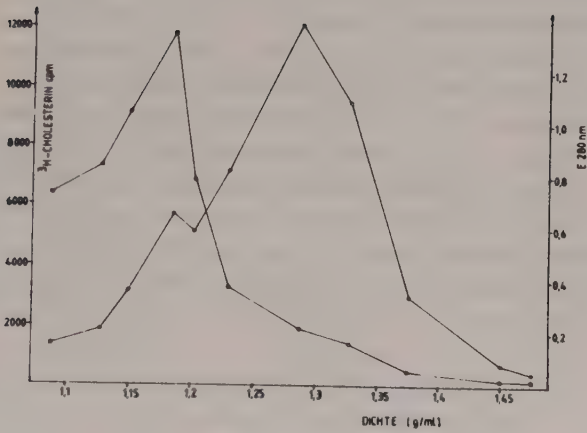


Abb.11

Verteilungsmuster nach Ultrazentrifugation von
Material aus der Gruppe "Normalpersonen"

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

○—○ Extinktion bei 280 nm

Zu erwarten war der beobachtete hohe Radioaktivitätspeak mit korrelierendem Proteinnachweis im niedrigen Dichtebereich von 1,18 g/ml; befremdlich erschien jedoch zunächst ein hoher Proteinpeak im Dichtebereich um 1,3 g/ml.

Eine elektrophoretische Kontrolluntersuchung der Proteine der beiden Dichtebereiche zeigte allerdings einheitliche Bandenmuster, sodaß diese Proteinverteilung auf eine während der Ultrazentrifugation ablaufende Delipidisierung des Proteolipidkomplexes zurückzuführen ist. Offenbar ist die Substanz derart empfindlich, daß die Beschleunigung der Ultrazentrifugation das Material zu zerlegen vermag.

6.6 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose

Das Ergebnis der Affinitätschromatographie von Material aus der Gruppe "Normalpersonen" ist in Abb. 12 dargestellt:

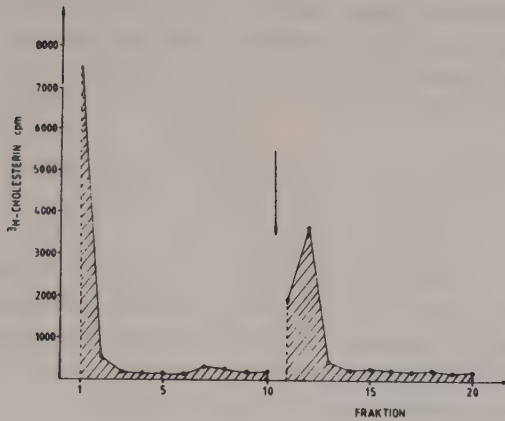


Abb. 12

Affinitätschromatographie von Material der Gruppe
"Normalpersonen" über Con A - Sepharose

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

Der Pfeil markiert die Zugabe von Elutionslösung
zur Entfernung gebundener Kohlenhydratanteile

Man sieht deutlich, daß wesentliche Anteile des radioaktiven Materials retiniert werden; ein Flächenvergleich der beiden schraffierten Bezirke zeigt, daß 52% des gesamten Materials an Concanavalin A gebunden wird, mithin also D-Mannosyl- oder D-Glucosyl-Reste enthält, ein gewichtiger Hinweis auf einen beträchtlichen Kohlenhydratan- teil der Substanz.

6.7 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

Sephacryl S 1000 ist ein Material mit einer Ausschlußgrenze von ca. 100 Mio. Die Chromatographie sollte die Molekulargewichtsverteilung der untersuchten Proben aufzeigen.

Das Ergebnis eines entsprechenden Laufes ist in Abb. 13 dargestellt:

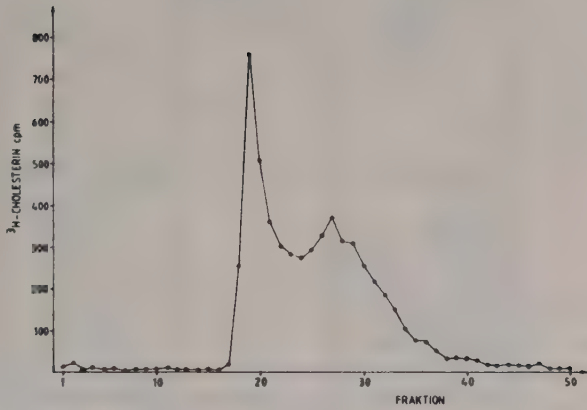


Abb. 13

Chromatographie von Material aus der Gruppe "Normalpersonen" über Sephacryl S 1000

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

Auffällig ist der hohe, spitze Peak im Ausschlußvolumen der Säule; ein Großteil des Materials muß daher ein Molekulargewicht über 100 Mio. aufweisen. Ein beträchtlicher Teil der Probe wird offenbar im Einschlußvolumen der Säule retiniert; die flach abfallende Flanke des zweiten Peaks zeigt jedoch, daß nicht eine Substanz einheitlicher Größe, sondern eine relativ breite Molekulargewichtsverteilung vorliegt.

6.8 Elektronenmikroskopie

Das verwendete Verfahren des negative-staining eignet sich hervorragend zur Darstellung von hochmolekularen globulären Partikeln. Abb. 14 zeigt eine Übersicht von elektronenmikroskopischen Aufnahmen des untersuchten Materials:

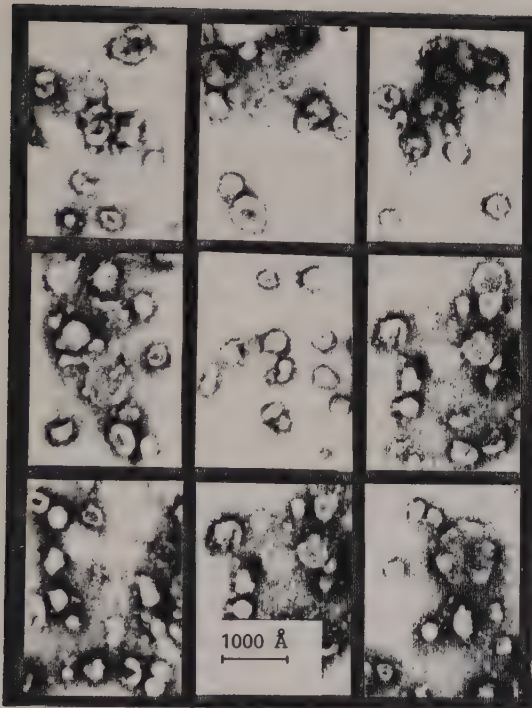


Abb. 14

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Material
der Gruppe "Normalpersonen" in 120.000-facher
Vergrößerung

Man sieht deutlich die zumeist kreisrunden Gebilde mit typischem schwarzem Rand, der auf die "Tröpfchenform" des Materials hinweist. Auffällig ist die breite Größenverteilung mit Durchmessern von 25 bis über 100 nm. Eine globuläre Form der Gebilde vorausgesetzt, läßt sich damit unter Zugrundelegung der bei der Ultrazentrifugation ermittelten Dichte von 1,18 g/ml ein Molekulargewichtsbereich von ca. 6 bis über 360 Mio. errechnen.

7. DISKUSSION

7.1 Testung; Konservieren; Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins

Die Untersuchung des Urins mit Hilfe von Reagenzstreifen stellt eine einfache und rasche Methode zur orientierenden Bestimmung der erwähnten Substanzen dar; erwartungsgemäß ließ sich regelmäßig Eiweiß in Urinproben von Patienten mit Nephrotischem Syndrom nachweisen.

Die Zugabe von Konservierungsstoffen erfolgte erst nach der Testung des Urins, um eine eventuelle Verfälschung der Farbreaktionen zu vermeiden. Während Natriumazid vorwiegend zur Verhinderung mikrobiellen Wachstums diente, wurde Phenylmethansulfonylfluorid zur Hemmung von Proteasen und Peptidasen zugesetzt. Besonders im Hinblick auf die später durchzuführende elektrophoretische Auftrennung der untersuchten Proteine war eine Hemmung der erwähnten Enzyme unabdingbar, da durch deren Einwirkung eine massive Verfälschung des Bandenmusters hervorgerufen werden kann.

Gewarnt sei vor den toxischen Eigenschaften der benutzten Substanzen. Natriumazid ist für seine hohe Giftigkeit bekannt, während über Phenylmethansulfo-

nylfluorid noch keine ausreichenden toxikologischen Daten vorliegen. Ein Hautkontakt mit diesen Stoffen als Festsubstanz oder in Lösung muß daher unbedingt vermieden werden.

Die Fällung des Tamm-Horsfall-Mucoproteins, einer in den Tubulusepithelien der Niere gebildeten Substanz, durch Zugabe von Kochsalz erleichterte die anschließende Ultrafiltration, da eine niedrige Proteinkonzentration den Filtrationsvorgang deutlich beschleunigt.

7.2 Ultrafiltration

Je nach Proteingehalt der untersuchten Proben dauerte dieser Präparationsschritt unterschiedlich lange; am zeitaufwendigsten erwies sich die Bearbeitung von Proben der Gruppe "Nephrotisches Syndrom" mit einer Filtrationsdauer von bis zu 50 Stunden. Bei einer derart hohen Eiweißbeladung der Proben veränderte sich durch Niederschlagsbildung auf den Membranen deren Filtrationseigenschaft; es waren daher in der weiteren Präparation zusätzliche gelchromatographische Reinigungsschritte erforderlich.

7.3 Inkubation mit radioaktivem Tracer

Die Zugabe eines radioaktiven Tracers ermöglicht die Markierung und den Nachweis selbst geringster Mengen der untersuchten Substanz.

Hier wurde Cholesterin verwendet, das mit einem Tritiumatom markiert war. Das radioaktive Cholesterin stand bei der Inkubation im Austausch mit dem endogenen freien Cholesterin und adsorbierte sich somit an alle Substanzen, die unverestertes Cholesterin enthielten. Nach Fraktionierung der Urinproben konnte daher durch einfache Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler die Cholesterinverteilung anhand der Aktivitätskurven bestimmt werden.

Das verwendete Tritium ist ein β -Strahler niedriger Energie, dessen Strahlung kaum ein Blatt Papier zu durchdringen vermag. Die strikte Vermeidung einer Inkorporation vorausgesetzt, läßt sich ein gefahrloses Arbeiten mit diesem Isotop gewährleisten.

7.4 Gelchromatographische Präparation

Die Gelchromatographie ermöglicht die Auftrennung eines vorliegenden Stoffgemisches entsprechend der Molekulargewichtsverteilung der einzelnen Inhalts-
substanzen.

Da ein hoher Eiweißgehalt die Trennschärfe der Präparation verschlechtern kann, erwies es sich als vorteilhaft, zur Vorreinigung eine mit Sephadex G 100 beschickte Säule zu verwenden, die alle Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 100.000 retinierte. Die Notwendigkeit einer derartigen Vorreinigung ergab sich u.a. aus den oben erwähnten insuffizienten Trenneigenschaften der Ultrafiltration bei Proben mit starker Eiweißbelastung. In der nachfolgenden endgültigen Auftrennung der Proben auf einer mit Biogel A 5m beschickten Säule konnte schließlich auch bei Urinproben mit höchster Eiweißkonzentration eine zufriedenstellende Trennung in bis zu drei sauber darstellbare Peaks erreicht werden.

7.5 Proteinbestimmung

Die bekannte Proteinbestimmung nach Lowry wurde im vorliegenden Fall durch einen Vorreinigungsschritt modifiziert, der vornehmlich zur Entfernung störender Lipide diente. Hierzu wurden die Eiweiße durch Zugabe von 20%-iger Trichloressigsäure präzipitiert und abzentrifugiert; nach Auflösung des Sediments in Natronlauge erfolgte in üblicher Weise die Proteinbestimmung.

Vor allem bei Vorliegen geringster Eiweißmengen erwies sich die Handhabung der Methode insofern als diffizil, als ein Abschwemmen des oft winzigen Sedimentationspellets nach Zentrifugation bei der Dekantation verhindert werden mußte.

7.6 Immunodiffusion nach Ouchterlony

Die Immunodiffusion nach Ouchterlony stellt ein einfach zu handhabendes Verfahren dar und ließ sich problemlos durchführen. Das verwendete Färbeverfahren (30) erwies sich als außerordentlich empfindlich; auch geringe Präzipitatenmengen konnten nachgewiesen werden.

7.7 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese

Die Elektrophorese des Proteinanteils der untersuchten Substanz stellte den schwierigsten Teil der Ausarbeitung der Methodik dar. Elektrophoreseversuche mit den unterschiedlichsten Rezepturen zeigten lange Zeit nur enttäuschende Ergebnisse mit breit "verschmierten" Farbstreifen und nur undeutlich erkennbaren Einzelbanden.

Die Verfolgung dreier Ansätze führte schließlich

zum gewünschten Erfolg:

- Eine Delipidisierung der untersuchten Substanzen vor der Elektrophorese.

Hierbei erwies sich das beschriebene Verfahren unter Verwendung von Äther als am wirkungsvollsten. Bei mehrfachen Kontrolluntersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß in der dekantierten Ätherphase kein Protein mit verlörending.

- Eine mehrtägige Inkubation der Substanzen mit SDS.

Die Erfahrungen bei Versuchen zur elektrophoretischen Darstellung von Lektinen zeigten, daß diese Moleküle häufig in erstaunlich stabilen Aggregatformen vorliegen (43). Je nach Aggregationsgrad einiger weniger Grundsubstanzen können auf diese Weise die unterschiedlichsten Molekulargewichtsverteilungen mit entsprechend heterogenen Bandenmustern in der Elektrophorese entstehen. Eine längere SDS-Inkubation führte jedoch zu einer Zerlegung dieser Aggregate.

Die untersuchten Urinproteine zeigten in ihrem Verhalten eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit den erwähnten Lektinen. Die Langzeitinkubation brachte eine schlagartige Verbesserung der Elektrophoreseergebnisse mit deutlicher Reduzierung der Bandenanzahl. In den Versuchen erwies sich eine viertägige Inkubation bei 50°C als

reichend; längere Inkubationszeiten führten zu keiner weiteren Verbesserung.

- Die Verwendung von Gradientengelen.

In einem Gradientengel nimmt die Acrylamidkonzentration in Laufrichtung der Proteine zu. Da mit steigender Acrylamidkonzentration die Porengröße des Gels immer geringer wird, nimmt entsprechend die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe ab. Bei einer bestimmten, von Größe und Form des jeweiligen Proteinmoleküls abhängigen Porengröße kommt die Proteinwanderung schließlich zum Stillstand.

Diese Eigenschaften des Gradientengels sind weitgehend unabhängig von Einflußfaktoren wie Proteinkonzentration, pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur usw., Parametern, die jedoch bei den herkömmlichen Elektrophoreseverfahren genauestens beachtet werden müssen, speziell bei der weit verbreiteten Disk-Elektrophorese, deren Optimierung nur mit Hilfe komplizierter mathematischer Modelle durchzuführen ist.

Ein weiterer Vorteil der Gradientengel-Elektrophorese besteht darin, daß, wie sich aus dem oben gesagten leicht ableiten läßt, die Bandenschärfe mit fortschreitender Elektrophoresedauer eher zunimmt, während bei den herkömmlichen

Verfahren die Bandenbreite aufgrund von Diffusionseffekten mit der Zeit wächst. Die zeitabhängige Bandenverbreiterung war mit ein Grund für die Entwicklung der einfachen und rasch durchzuführenden Ultradünnschicht-Elektrophorese; im vorliegenden Fall wurde dennoch auf die Anwendung dieser eleganten Methode verzichtet, um durch die Verwendung von 1,5 mm dicken Gelen ein präparativ arbeitendes Verfahren zur Verfügung zu haben; der Nachteil der längeren Elektrophoresedauer konnte durch die Gradientengel-Technik kompensiert werden.

Die Dokumentation der Elektropherogramme erfolgte durch Densitometrie der gefärbten Gele, was die nachfolgende Auswertung erleichterte und die Genauigkeit erhöhte. Die Verwendung des bekannten Newton'schen Näherungsverfahrens durch polynomiale Interpolation erbrachte in Verbindung mit der Gradientengel-Elektrophorese Reproduziergenauigkeiten mit Absolutabweichungen unter 2,5%. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß das Newton'sche Verfahren keine Extrapolation über den von den Referenzsubstanzen abgedeckten Molekulargewichtsbereich hinaus gestattet; hier führt die herkömmliche Auswertungsmethode mit halblogarithmischer Darstellung der Molekulargewichte gegen die r_f -Werte der einzelnen Banden zu besseren Ergebnissen.

7.8 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation stellt ein einfach durchzuführendes und reproduziergenaues Verfahren zur Auftrennung von Substanzen entsprechend ihrer Dichte dar.

Während der 72-stündigen Zentrifugation der Lösung bei 50.000 upm entsprechend einer Beschleunigung von 256.000 g in Röhrchenmitte bildete sich in der zuvor homogenen Cäsiumchloridlösung ein Dichtegradient; die eingebrachten Substanzen konzentrierten sich entsprechend dem Archimedischen Prinzip scheibenförmig in dem ihrer eigenen Dichte korrespondierenden Bereich.

Nach Fraktionierung des Röhrcheninhalts konnte in den einzelnen Fraktionen die Extinktion bei 280 nm, die Radioaktivität und die Dichte durch Abwiegen bestimmt werden. Leider stand ein Refraktometer zur Dichtebestimmung nicht zur Verfügung; bei sorgfältigem Arbeiten lieferte jedoch auch die Wägemethode zufriedenstellende Ergebnisse.

Wie bereits erwähnt zeigten sich zwei deutliche Proteinmaxima bei 1,18 und 1,3 g/ml, die jedoch nach elektrophoretischer Auftrennung weitgehend identische Bandenmuster lieferten. Die niedrige Radioaktivität im zweiten Proteinpeak bei gleich-

zeitig hoher Dichte läßt jedoch auf einen sehr niedrigen Lipidanteil schließen; offensichtlich sind die starken Beschleunigungskräfte der Ultrazentrifugation in der Lage, den hochmolekularen Komplex zu zerlegen, ein weiterer Hinweis auf dessen aggregatähnliche Molekülkonfiguration.

7.9 Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose

Das aus *Canavalia ensiformis* gewonnene Lektin Concanavalin A bindet spezifisch D-Mannosyl- und D-Glucosyl-Reste. In Con A - Sepharose liegt Concanavalin A gebunden an Sepharosegel-Partikel vor, sodaß mit dieser Substanz eine Affinitätschromatographie von endständig D-Mannosyl- oder D-Glucosylhaltigen Stoffen möglich ist (36).

Im vorliegenden Fall wurden 52% der Radioaktivität retiniert, ein deutlicher Hinweis auf einen nicht unbeträchtlichen Kohlenhydratanteil der untersuchten Substanz. Dieses Ergebnis ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert:

- Der Kohlenhydratanteil weist auf die Herkunft des hochmolekularen Komplexes aus Zelloberflächenmaterial hin
- Kohlenhydrate können bei entsprechender Größe

zu Störungen im Bandenmuster der Elektrophorese führen. Weitere Versuche müssen klären, ob nach Entfernung der Kohlenhydrate veränderte Elektropherogramme entstehen.

7.10 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

Sephacryl S 1000 dient zur gelchromatographischen Trennung von Substanzen hohen Molekulargewichts; die Ausschlußgrenze beträgt 100 Mio. Dalton.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand Sephacryl S 1000 noch nicht zur Verfügung; die präparative Gelchromatographie erfolgte daher mit dem seit längerem bekannten Biogel A 5m. Nach Erscheinen des Sephacryl S 1000 auf dem Markt bot sich dessen Verwendung zur analytischen Chromatographie an. Die erwähnten Ergebnisse lassen eine deutliche Heterogenität der präparierten Substanz vermuten; es muß weiter abgeklärt werden, ob durch präparative Chromatographie über Sephacryl S 1000 sich eine bessere Reinigung des hochmolekularen Proteo-lipidkomplexes erreichen läßt.

7.11 Elektronenmikroskopie

Bei Partikeln mit Molekulargewichten im Bereich

von mehreren Mio. Dalton bietet sich die Elektronenmikroskopie zur Untersuchung und Darstellung der äußeren Form an. Der negative-stainig-Effekt entsteht durch ringförmige Anlagerung des wolframhaltigen Kontrastmittels um die Basis von globulären, dem Kohlefilm aufliegenden Teilchen.

Wie die Abb. 14 verdeutlicht, lassen sich auf diese Weise eindeutig globuläre Partikel darstellen; der aus dem Durchmesser unter Zugrundelegung der Dichte ermittelte Molekulargewichtsbereich zeigt eine gute Übereinstimmung mit den durch Gelchromatographie gewonnenen Ergebnissen.

7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die gewonnenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen und interpretieren:

Wie bereits Cenedella (11) und Jüngst (26) nachgewiesen haben und in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte, liegt das Cholesterin im Urin gebunden an einen hochmolekularen Proteolipidkomplex vor. Es handelt sich dabei jedoch keineswegs um eine einheitliche Substanz, wie gel-chromatographische, affinitätschromatographische und elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden gezeigt haben. Bei aller Heterogenität konnten aber in immunologischen und elektrophoretischen Untersuchungen einfache und kennzeichnende Merkmale dargestellt werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, es könnte sich um Molekülaggregate gleichartiger Untereinheiten handeln, eine Annahme, die unterstützt wird durch die Beobachtungen bei den Vorversuchen zur elektrophoretischen Trennung des Proteinanteils. Die Elektrophorese bereitete anfangs außerordentliche Schwierigkeiten und ließ ein komplexes, uneinheitliches und unsauberes Bandenmuster entstehen. Erst nach mehrtägiger SDS-Inkubation bei höheren Temperaturen gelang es, die Aggregate in

ihre "Monomeren" zu zerlegen und überschaubare und reproduzierbare Bandenmuster zu gewinnen.

Die Herkunft des Materials scheint zellulärer, nichtplasmatischer Art zu sein, wobei gewichtige Hinweise vorliegen, daß es sich um Zellmembranbestandteile handeln könnte. So konnte bereits Cenedella (11) in makromolekularen Urin-Proteolipidkomplexen Markerenzymmuster und typische Lipid-Protein-Verteilungen feststellen, die diesen Schluß zuließen. Das oben erwähnte Verhalten des Materials während der Inkubation ist ebenfalls typisch für Zelloberflächensubstanzen, speziell der Lektine (43). Die positive immunologische Reaktion gegen Anti-LSP und Anti-KSP, Antikörpern, die gegen Oberflächenbestandteile von Leber- und Nierengewebszellen gerichtet sind, und schließlich der Nachweis von Kohlenhydraten mit Hilfe der Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose weisen noch unmißverständlicher auf diese These hin.

Inwieweit die bei den verschiedenen Krankheitsbildern gefundenen unterschiedlichen Elektrophoresemuster als typisch für die jeweilige Grundkrankheit zu gelten haben, kann vorerst aufgrund der niedrigen Fallzahlen noch nicht gesagt werden. Zunächst erscheint es dringlich, den untersuchten Proteolipidkomplex weiter abzuklären, wobei immu-

nologische Untersuchungen im Vordergrund stehen dürften. Bewußt wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung der einfacheren und schnelleren Ultradünnschicht-Elektrophorese verzichtet und die Optimierung des herkömmlichen Verfahrens vorangetrieben, sodaß nunmehr ein sowohl analytisch wie präparativ arbeitendes Werkzeug mit guter Reproduziergenauigkeit und Trennschärfe zur Verfügung steht. Interessant erscheint vor allem die selektive Gewinnung von Material der 37.800 - Bande zur Immunisierung eines Versuchstiers; der so gewonnene Antikörper ließe in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Gewebsschnitten Rückschlüsse auf genaue Lokalisation und Herkunft des zugrundeliegenden Materials zu.

Sollten sich in Zukunft tatsächlich reproduzierbare krankheits- bzw. organspezifische Bandenmuster in der Elektrophorese nachweisen lassen, könnten - nach Gewinnung entsprechender selektiver Antikörper - bei Erkrankungen des Urogenitalsystems durch einfache Immunoassays im Urin der betroffenen Menschen Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Krankheit oder das befallene Organ gezogen werden.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Acevedo, H.F., Campbell, E.A.:
Urinary cholesterol III. Its excretion as a
protein-bound complex.
Steroids 16, 569 (1970)
2. Acevedo, H.F., Campbell, E.A., Saier, E.L.:
Urinary cholesterol V. Its excretion in men
with testicular and prostatic neoplasms.
Cancer 32, 196 (1973)
3. Acevedo, H.F., Campbell, E.A., Frich, J.C.:
Urinary cholesterol VI. Its excretion in wo-
men with inoperable inflammatory carcinoma
of the breast.
Cancer 34, 1727 (1974)
4. Acevedo, H.F., Campbell, E.A., Frich, J.C.:
Urinary cholesterol VII. The significance of
the excretion of nonesterified cholesterol
in patients with uterine carcinomas.
Cancer 36, 1459 (1975)
5. Acevedo, H.F., Campbell, E.A., Frich, J.C.:
Urinary cholesterol VIII. Its excretion in
women with ovarian neoplasms.
Cancer 37, 2847 (1976)

6. Behrens, U., Paronetto, F.:
Studies on "Liver-Specific" Antigens I.
Evaluation of the Liver Specificity of "LSP"
and "LP-2".
Gastroenterology 77, 1045 (1979)
7. Belis, J.A., Cenedella, R.J.:
Urinary nonesterified cholesterol excretion
in adenocarcinoma of the prostate.
Cancer 43, 1840
8. Bibliographisches Institut Mannheim:
Interpolation.
Meyers Großer Rechenruden, Dudenverlag 1964
9. Bruger, M.:
Cholesteroluria in Bright's disease.
Am. J. Clin. Path. 5, 504 (1935)
10. Butenandt, A., Dannenbaum, H.:
Über die Ausscheidung von Cholesterin im
Harn.
Z. Physiol. Chem. 248, 151 (1937)
11. Cenedella, R.J., Belis, J.A.:
Studies on the source of urinary cholesterol
in the normal male.
J. Lipid Res. 22, 122 (1981)

12. Chu, T.M., Shukla, S.K., Mittelman, A.:
Comparative evaluation of serum acid phosphatase, urinary cholesterol and androgens in diagnosis of prostatic cancer.
Urology 6, 291 (1975)
13. Foreman, J.R., Karlin, J.B., Edelstein, C.:
Fractionation of human serum lipoproteins by single-spin gradient ultracentrifugation: quantification of apolipoproteins B and A-I and lipid components.
J. Lipid Res. 18, 759 (1977)
14. Frick, J., Spiteller, G.:
Cholesterin und Harntrakterkrankungen.
Zeitschr. f. Urologie 61, 833 (1961)
15. Fulk, F., Siebenrock, L.:
Zur Frage der Lipoidtröpfchen im Harnsediment.
Med. Klin. 7, 739 (1911)
16. Gardner, J.A., Gainsborough, H.:
Cholesterol secretion in the urine. Part I.
Biochem. J. 19, 667 (1925)
17. Griffith, O.M.:
Techniques of preparative zonal, and continuous flow ultracentrifugation.

Applications Research Department, Spinco
Division, Beckman Instruments Inc., Palo
Alto, Calif., 5 (1976)

18. Grunke, W.: Über die Ausscheidung des Cholesterins im Harn.
Biochem Z. 132, 543 (1922)
19. Jäckle, H.:
Visualization of Proteins after Isoelectric
Focusing during Two-Dimensional Gel-Electrophoresis.
Anal. Biochem. 98, 81 (1979)
20. Jones, O.C., Price, J.M.:
Some methods of electron microscopic visualization of lipoproteins in plasma and chyle.
J. Histochem. Cytochem. 16, 366 (1968)
21. Jüngst, D., Stadler, A., Pickel, A.:
Cholesterin im Urin bei malignen Erkrankungen.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 84, 574 (1978)
22. Jüngst, D., Pickel, A., Marx, F.J.:
Urinary cholesterol excretion in men with
benign prostatic hyperplasia and carcinoma

of the prostate.

Cancer 43, 361 (1979)

23. Jüngst, D., Pickel, A., Stadler, A.:

Comparative evaluation of nonesterified and total urinary cholesterol in papilloma and carcinoma of the bladder.

Cancer 43, 2486 (1979)

24. Jüngst, D., Wallner, J., Karl, H.J.:

Correlation of total cholesterol and protein in urine in patients with the nephrotic syndrome.

Klin. Wschr. 58, 1215 (1980)

25. Jüngst, D., Wallner, J., Pickel, A.:

Studies on the clinical significance of non-esterified and total cholesterol in urine.

Klin. Wschr. 11, 545 (1981)

26. Jüngst, D.:

Cholesterin im Urin - Grundlagen und klinische Bedeutung

Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1982

27. Kaiserling, C., Orgler, A.:

Über das Auftreten von Myelin in Zellen und

- seine Beziehung zur Fettmetamorphose.
Arch. f. path. Anat. u. Physiol. 167, 296
(1902)
28. Kayser, F., Balat, R.:
Sur la presence et sur l'origine du chole-
sterol dans l'urine.
Bul. Soc. Chim. Biol. 34, 806 (1952)
29. Klahr, S., Tripathy, K., Bolanos, O.:
Qualitative and quantitative analysis of
urinary lipids in the nephrotic syndrome.
J. Clin. Invest. 16, 1457 (1967)
30. Lamerz, R., Fateh-Moghadam, A.:
Quantitative Immunglobulinbestimmungen,
Grundlagen - Methodik - Bewertung.
Das medizinische Laboratorium 11, 243 (1969)
31. Laudat, M.H., Laudat, Ph.:
Les lipides urinaires.
Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 13, 168 (1968)
32. LKB Application Note 320, Fa. LKB Producter,
Bromma, Schweden
33. Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.:
Protein measurement with the Folin phenol

reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

34. Munk, F.:

Pathologie und Klinik der Nephrosen, Nephritiden und Schrumpfnieren; Einführung in die moderne klinische Nierenpathologie.

Berlin, Urban und Schwarzenberg, 376 (1918)

35. Ouchterlony, D.:

Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis.

Ann Arbor Science Publishers. Ann Arbor, MI. 21 (1969)

36. Pharmacia Fine Chemicals:

Affinity Chromatographie, principles and methods.

Fa. Pharmacia Fine Chemicals, 52

37. Schrade, W., Böhle, E., Becker, G.:

Über die Ausscheidung von Lipoproteiden im Urin bei den sogenannten Albuminurien.

Dtsch. Arch. Klin. Med. 202, 415 (1955)

38. Segal, P., Gidez, L.I., Vega, G.L.:

Apoproteins of high density lipoproteins in

the urine of normal subjects.

J. Lipid Res. 20, 784 (1979)

39. Spiteller-Friedmann, M., Spiteller, G.:
Zur Frage der Ausscheidung von Cholesterin
im Harn bei verschiedenen Erkrankungen (vor-
nehmlich bei Tumorerkrankungen des Urogeni-
taltrakts).
Österr. Zeitschr. f. Krebsforsch. 5, 25 (1971)
40. Tamm, I., Horsfall, F.L. Jr.:
A mucoprotein derived from human urine with
influenza, mumps, and newcastle disease viruses.
J. Exp. Med. 96, 71 (1952)
41. Vela, B.A.; Acevedo, H.F.:
Determination of urinary cholesterol by gas-
liquid chromatography.
Steroids 14, 499 (1969)
42. Weber, K., Osborn, M.:
The Reliability of Molecular Weight Determi-
nations by Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide
Gel Electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

43. Wieser, R., Brunner, G.:

Interaktions- und Regulationsmechanismen der
Zelle: Membranlektine - Membranglykomoleküle.
Biol. i. uns. Zeit 12, 97 (1982)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med.
D. Jüngst für die Überlassung des Themas und die
Betreuung während der Arbeit.

Frau B. Häuserer danke ich für ihre bereitwillige
und umfangreiche Hilfe bei den Laborarbeiten.

Darüberhinaus möchte ich Frau Dr. U. Behrens, Immu-
nopathology Laboratory, VA Medical Center, Bronx,
New York, für die Bereitstellung der Antiseren
gegen LSP und KSP sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. med.
E. Siess, Institut für Diabetesforschung, München,
für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen
Abbildungen danken.

LEBENS LAUF

24. Mai 1958 geboren in Hindelang als zweites Kind des kriegsblinden Verwaltungsangestellten Wenzel Weiser und der Verwaltungsangestellten Anneliese Weiser, geb. Kocher
- September 1964 Einschulung in die Grundschule Sonthofen
- September 1968 Übertritt an das Gymnasium Oberstdorf
- Juni 1977 Ablegung der Reifeprüfung
- November 1977 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- August 1979 Ärztliche Vorprüfung
- August 1980 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- November 1980 Beginn der Vorarbeiten zur vorliegenden Dissertation
- März 1983 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- April 1984 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Erteilung der Ärztlichen Approbation
- Juni 1984 bis August 1985 Ableistung des Grundwehrdienstes als Truppenarzt des Gebirgsinstandsetzungsbataillons der Gebirgsdivision der Bundeswehr in Sonthofen
16. August 1985 Vermählung mit Fräulein Eva Lobentanzer
- September 1985 Beginn einer Assistenzarztstätigkeit auf der chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Sonthofen.

Sonthofen, Oktober 1985

Herbert Weiser

Herbert Weiser

